

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/017996 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 31/16, 31/167, 31/19, 31/4045, 31/4406, 38/55, A61P 19/02, 43/00
- (74) 代理人: 長井 省三, 外(NAGAI,Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010460
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 19 日 (19.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-239203 2002 年 8 月 20 日 (20.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2004/017996 A1

(54) Title: ARTHRODIAL CARTILAGE EXTRACELLULAR MATRIX DEGRADATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤

(57) Abstract: An arthrodiacal cartilage extracellular matrix degradation inhibitor, which contains a compound inhibiting histone deacetylase as the active ingredient, is useful in preventing and treating diseases and pathological conditions in which the degradation and denaturation of arthrodiacal cartilage extracellular matrix participate, in particular, osteoarthritis, articular rheumatism, arthritis deformans, etc.

(57) 要約: ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物を有効成分として含有する本発明の関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤は、関節軟骨細胞外マトリクス分解・変性の関与する疾患や病態、殊に骨関節炎、関節リウマチ、変形性関節症等の予防並びに治療に有用である。

明 細 書

関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤

技術分野

本発明は、骨関節炎、関節リウマチ、変形性関節症などの関節疾患の治療剤として有用な関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤に関する。

背景技術

細胞の核内の DNA はヌクレオソームを基本としたクロマチン構造を形成している。ヌクレオソームはコアヒストン（ヒストン H2A, H2B, H3, H4 それぞれ 2 分子ずつから成る 8 量体）と DNA とが巻き付いた構造体で、ヒストン N 末端に存在する正電荷を帯びたリジン残基は負電荷を帯びた DNA と電荷的に安定な状態を形成することでヌクレオソームは高次に折り畳まれた状態で存在している（Wolffe, A.P. et al Cell 84, 817-819, 1996）。核内で遺伝子の転写反応が起こるためにはその構造を解けた状態にして、様々な転写因子が DNA に接触できるようにすることが必要である。転写が抑制されている遺伝子領域のヒストンはアセチル化の程度は少なく、活発に転写が起こっている遺伝子領域のヒストンは強くアセチル化されているといったように、ヒストンのアセチル化と、転写活性化の関連性が以前より知られていた（Hebbes, T.R. et al EMBO J. 7, 1395-1402, 1988、Grunstein, M. et al Nature 389, 349-352, 1997）。ヌクレオソーム中のヒストンのリジン残基がアセチル化されるとその正電荷は中和され、ヌクレオソーム構造が弛緩することで様々な転写因子が DNA に接触できるようになり、転写が起こりやすくなると考えられている（Hong, L. et al J. Biol. Chem. 268, 305-314, 1993）。

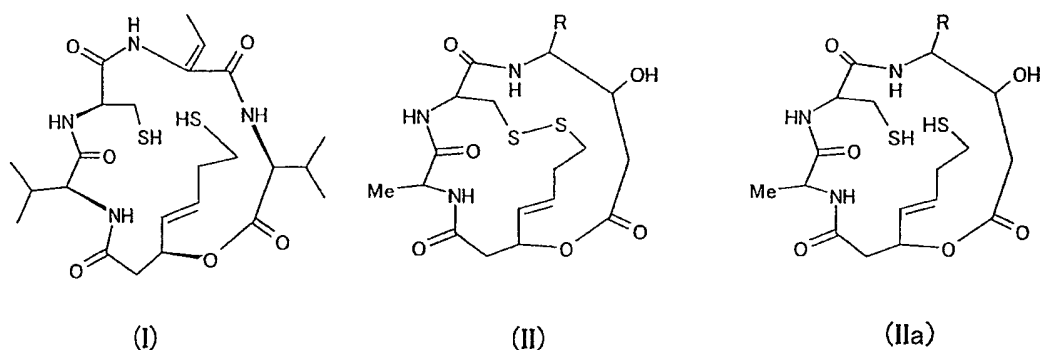
ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル化酵素（ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (Histone Acetyltransferase); HAT）とヒストン脱アセチル化酵素（ヒストンデアセチラーゼ (Histone Deacetylase); HDAC）とのバランスによって制御されていることが知られており、近年、いくつかの HAT 並びに HDAC が同定されその転写調節における重要性が報告されている（Ogryzko, V.V. et al Cell 87, 953-959, 1996、Brown, C.E. et al

Trends Biochem.Sci. 25(1), 15-19, 2000、Grozinger,C.M. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96, 4868-4873, 1999)。

一方で、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導など多彩な作用を有する酪酸は、細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、HDAC 阻害作用を有することが以前より知られていた (Counsens,L.S.et al J.Biol.Chem. 254, 1716-1723, 1979)。また、微生物代謝産物の Trichostatin A (TSA)は細胞周期の停止、分化誘導を示すことが知られていたが (Yoshida,M. et al Cancer Res 47, 3688-3691, 1987、Yoshida,M. et al Exp.Cell Res 177, 122-131, 1988)、細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、部分精製した HDAC を用いた検討から TSA が強力な HDAC 阻害剤であることが明らかとなった (Yoshida,M. et al J.Biol.Chem. 265, 17174-17179, 1990)。

他の HDAC 阻害剤についても研究が進んでいる。微生物代謝産物である Trapoxin は細胞増殖を抑制し、v-sis 形質転換細胞の形態を正常化する作用が知られていたが (Itazaki,H. et al J.antibiotics 43(12), 1524-1534,1990)、後に HDAC 阻害剤であることが明らかとなった (Kijima,M. et al J.Biol.Chem. 268, 22429-22435, 1993)。その阻害形式は不可逆的であることから、この Trapoxin を分子プローブとしてこれに結合するヒト HDAC のクローニングも報告されている (Taunton,J. et al Science 272 408-411, 1996)。その他、Depudecin (Kwon,H.J. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95, 3356-3361, 1998)、Phenylbutyrate (Warrell,R.P.Jr. et al J.Natl.Cancer Inst. 90(21), 1621-1625, 1998)、Pivaloyloxymethyl butyrate (Aviram, A. et al Int.J.Cancer 56, 906-909, 1994)、MS-27-275 (Saito,A. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597, 1999)、CI-994 (Howard, C.T et al Proc.Am.Assoc.Cancer Res. abst #2886, 2002)、SAHA (Richon,V.M. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95, 3003-3007, 1998)、CHAP (cyclic hydroxamic acid-containing peptide) (Furumai,R. et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 98, 87-92, 2001)、Valproic acid (Gottlicher, M. EMBO J. 20, 6969-78, 2001)、NVP-LAQ824 (Perez, L.B. et al Proc.Am.Assoc.Cancer Res. abst #3671, 2002、WO02/22577 公報)、Apicidin (Cancer Res. 60, 6068-6074, 2000) などの化合物が HDAC 阻害作用を有することが報告されている。

また、最近になって、いくつかのデプシペプチド誘導体が良好な HDAC 阻害作用を有することが報告されている。例えば、FK228 (Nakajima, H. et al. Exp. Cell Res. 241, 126-133, 1998) 及び下式 (I) で示されるデプシペプチド化合物 (国際公開 WO02/06307 号パンフレット公報：特許文献 1)、下記一般式 (II) で示されるデプシペプチド化合物 (特開 2001-348340 号公報) 及び下記一般式 (IIa) で示されるデプシペプチド化合物 (特開 2001-354694 号公報) 等の報告がある。以下、式 (I) で示されるデプシペプチド化合物を FK228 還元体、一般式 (II) において R がイソプロピル基であるものを化合物 A、sec-ブチル基であるものを化合物 B、イソブチル基であるものを化合物 C、また一般式 (IIa) で示されるデプシペプチド化合物を化合物 A~C の還元体とそれぞれ略記する。



(式中 R は、イソプロピル基、sec-ブチル基又はイソブチル基を意味する。)

HDAC 阻害剤は、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導、アポトーシス誘導、血管新生阻害作用などを示すことから、抗腫瘍剤としての効果が期待されている (非特許文献 1 及び 2 参照)。またその他にも、例えば感染症、自己免疫疾患、皮膚病 (非特許文献 3 参照) などの細胞増殖性疾患の治療・改善薬、またハンチントン病などの進行性神経変性疾患の予防・治療薬 (非特許文献 4 参照)、さらに遺伝子治療におけるベクター導入の効率化 (非特許文献 5 参照)、導入遺伝子の発現亢進 (非特許文献 6 参照) など様々な応用も試みられている。

しかしながら、現在まで、HDAC と関節軟骨細胞外マトリクスの関連を示す具体的報告は無く、HDAC 阻害剤が関節軟骨細胞外マトリクス成分の分解・変性を阻害し、

関節軟骨細胞外マトリクス成分の分解・変性を伴う関節疾患の予防・治療に有用であることを示唆する報告も何等なされていない。

なお、前記 FK228 還元体の特許明細書(特許文献 1)には、FK228 還元体はその HDAC 阻害活性により異常な遺伝子発現によって引き起こされる疾患に有用として、多数の疾患が羅列されている中にリウマチ性関節炎や変形性関節症が挙げられているが、具体的な効果の記載は無く、治療効果を示す根拠も示されていない。また、国際公開 WO02/055017 号パンフレット(特許文献 2)には、HDAC 阻害剤が全身性エリトマトーデス患者から採取した T 細胞において異常な免疫関連遺伝子の発現を正常な状態にする効果が示されたことに基づき、関節リウマチを含む自己免疫疾患の治療に使用できるとの記載がある。しかしながら、関節リウマチに対する具体的な効果の開示は無く、HDAC 阻害剤が関節軟骨細胞外マトリクス成分の分解・変性を阻害することを示唆する記載も無い。

骨関節炎、関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)などの関節疾患は、関節軟骨の損傷・変性を主病変とする疾患である。関節疾患の中で最も患者数の多い疾患はOAであるが、現行の治療法においては鎮痛消炎剤やヒアルロン酸製剤が軟骨変性・軟骨下骨破壊に伴う痛みを軽減する目的で対症療法的に用いられているに過ぎず、十分な治療効果を上げているとは言えない状況にある。

関節疾患は、外傷による軟骨表面の亀裂、自己免疫の異常或いはマトリクスメタロプロテアーゼの異常等、様々の原因により生じ、その初期の段階においては関節軟骨における細胞外マトリクスの分解・変性が共通して観察される(非特許文献 7 及び 8 参照)。細胞外マトリクスは主に II 型コラーゲンと軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンから構成されており、どちらの破綻も細胞外マトリクスの破壊を引き起こし、軟骨組織の破壊につながる。さらにこの軟骨組織の破壊が、RA においては軟骨下骨組織の露出、破壊、変性を引き起こし、関節機能の障害を招く一方、OA においては軟骨下骨の増殖による骨棘形成や骨硬化を引き起こし、関節の変形を招く(前記非特許文献 8 参照)。そのため、古くからこれらの関節疾患に共通する細胞外マトリクスの分解・変性

を制御することが関節疾患の治療に繋がると考えられており、その分解を担うプロテアーゼ（コラゲナーゼ、アグリカナゼ）の同定、そして、それらの阻害剤の探索、医薬品としての開発の試みが精力的に行われてきている（前記非特許文献 7、9 及び 10 参照）。しかしながら、現在に至るまで、関節軟骨細胞外マトリクスの分解・変性を制御する関節疾患治療薬は上市されていない（非特許文献 11 及び 12 参照）。

今なお、関節軟骨細胞外マトリクスの分解を良好に阻害する医薬の創製が切望されている。

【非特許文献 1】 Marks, P.A. ら、「Journal of the National Cancer Institute」、2000 年、第 92 巻、p.1210-1216

【非特許文献 2】 Kim, M.S. ら、「Nature Medicine」、2001 年、第 7 巻、p.437-443

【非特許文献 3】 Darkin-Rattray, S.J. ら、「Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America」、1996 年、第 93 巻、p.13143-13147

【非特許文献 4】 Steffan, J.S. ら、「Nature」、2001 年、第 413 巻、p.739-743

【非特許文献 5】 Dion, L.D. ら、「Virology」、1997 年、第 231 巻、p.201-209

【非特許文献 6】 Chen, W.Y. ら、「Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America」、1997 年、第 94 巻、p.5798-5803

【非特許文献 7】 Ishiguro, N、「別冊・医学のあゆみ（細胞外マトリックス）」、医歯薬出版株式会社、1997 年 2 月 25 日、p.81-85

【非特許文献 8】 Ozaki, S ら、「知っておきたい骨・関節疾患の新たな診療」、真興交易（株）医書出版部、2001 年 11 月 20 日、p.46-95

【非特許文献 9】 Lohmander, L.S. ら、「Arthritis and Rheumatism」、1993 年、第 36 巻、第 9 号、p.1214-22

【非特許文献 10】 Malfait, A.M. ら、「Journal of Biological Chemistry」、2002 年、第 277 巻、第 25 号、p.22201-8

【非特許文献 11】 Close, D.R. ら、「Annals of the Rheumatic Diseases」、2001 年、第 60 巻、第 3 号、p.62-67

【非特許文献 1 2】Arner, E.C.ら、「Current Opinion in Pharmacology」、2002 年、第 2 巻、p.322-329

【特許文献 1】国際公開 WO02/06307 号パンフレット

【特許文献 2】国際公開 WO02/055017 号パンフレット

発明の開示

本発明者等は、HDAC 阻害化合物の作用につき鋭意検討する中で、多くの構造の全く異なる HDAC 阻害化合物が、いずれも良好な関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害作用を有することを知見し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、HDAC 阻害化合物を有効成分として含有する関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤に関する。殊に、関節軟骨細胞外マトリクスの分解・変性の関与する骨関節炎、関節リウマチ、変形性関節症等の予防又は治療剤に関する。

また、本発明は、HDAC 阻害化合物を有効成分として含有する骨関節炎、関節リウマチ又は変形性関節炎等における関節軟骨細胞外マトリクス分解の予防又は治療剤に関する。

また、本発明は、関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害用医薬の製造の為の HDAC 阻害化合物の使用に関する。

更に、本発明は、関節軟骨細胞外マトリクス分解に起因する疾患の予防及び治療方法であって、治療有効量の HDAC 阻害化合物を患者に投与することからなる予防及び治療方法に関する。

本発明は転写調節に関与する HDAC 阻害化合物が、意外にも骨関節炎の主病変である関節細胞外マトリクス分解・変性そのものを抑制し、骨関節炎治療の中心的役割を担え得る可能性を見出したものであり、まさに画期的な発明であるといえる。

以下、本発明につき詳述する。

本発明医薬に用いられる HDAC 阻害化合物としては、HDAC を阻害する化合物並びにその塩であり、具体的には、公知の HDAC 阻害化合物である、FK228 及びその還元

体、デプシペプチド化合物（化合物 A,B 及び C）及びそれらの還元体、MS-27-275、Trichostatin A、NVP-LAQ824、SAHA、Apicidin、酪酸及びその誘導体（Phenylbutyrate、Pivaloyloxymethyl butyrate、Valproic acid 等）、CI-994、Depudecin、Trapoxin 並びに CHAP などが挙げられる。これらの HDAC 阻害化合物は、市販されているか、文献既知の方法を用いて入手することができる。好ましくは、FK228 及びその還元体、デプシペプチド化合物（化合物 A,B 及び C）及びそれらの還元体、MS-27-275、Trichostatin A、NVP-LAQ824、SAHA、Apicidin、Phenylbutyrate 及び Valproic acid であり、より好ましくは、FK228 及びその還元体、デプシペプチド化合物（化合物 A,B 及び C）及びそれらの還元体、MS-27-275、Trichostatin A、NVP-LAQ824、SAHA 及び Apicidin である。また、同様の作用を持つこれらの化合物の誘導体も本発明の HDAC 阻害化合物として好適である。

HDAC 阻害活性は、公知の一般的方法、例えば、Yoshida, M. et al J.Biol.Chem. 265, 17174-17179, 1990 に記載の方法に従って容易に測定できる。具体的には、当該文献記載の方法で調製された^{[3]H}アセチルヒストン及びヒストン脱アセチル化酵素画分を使用し、被験化合物を^{[3]H}アセチルヒストンと DTT を含む反応溶液中に加え、室温にて 1 時間プレインキュベーション後、ヒストン脱アセチル化酵素画分を混合し室温にて 2 時間反応させ、1M 塩酸及び酢酸エチルを添加後、遠心分離により分離した酢酸エチル層中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより行うことができる。

代表的な HDAC 阻害化合物の、HDAC 阻害活性を引用文献名と共に示す。なお、化合物 A については上記方法にて測定した結果を示す。

- ・ FK228 : 1.1 nM (IC₅₀ 値 ; Exp.Cell Res. 241, 126-133,1998)
- ・ 化合物 A : 30 nM において約 85%阻害
- ・ MS-27-275 : 2 μM (IC₅₀ 値 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597, 1999)
- ・ 酪酸 (Na 塩) : 280 μM (IC₅₀ 値 ; Exp.Cell Res. 241, 126-133,1998)
- ・ Butyrates (酪酸, Phenylbutyrate, etc.) : mM オーダー (Nat. Rev. Drug Discov. 2002 1,

287-299, 2002)

- ・ Valproic acid : mM オーダー (Nat. Rev. Drug Discov. 2002 1, 287-299, 2002)
- ・ Trichostatin A : 2.1 nM (IC₅₀ 値 ; Exp.Cell Res. 241, 126-133, 1998)
- ・ NVP-LAQ824 : 0.03 μ M (IC₅₀ 値 ; Blood First Edition Paper, prepublished online June 19, 2003)
- ・ SAHA : 10~20 nM (IC₅₀ 値 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3003-3007, 1998)
- ・ Apicidin : 5 nM (IC₅₀ 値 ; Cancer Res. 60, 6068-6074, 2000)

本発明の別の好ましい HDAC 阻害化合物は、上記 Yoshida 等の方法により測定した HDAC 阻害活性 (IC₅₀ 値) が 100 μ M 以下、より好ましくは 10 μ M 以下、更に好ましくは 1 μ M 以下の化合物である。

以下に本発明の関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤の製剤化法及び投与方法を詳述する。

HDAC阻害化合物の1種又は2種以上を有効成分として含有する医薬組成物は、通常用いられている製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、液剤、注射剤、坐剤、軟膏、貼付剤等に調製され、経口的又は非経口的に投与される。

HDAC阻害化合物のヒトに対する臨床投与量は、HDAC阻害化合物の種類に応じて適宜設定することができる。通常経口投与の場合、1日当たり約0.001から500mg、好ましくは0.01~300mgが適当であり、これを1回であるいは2乃至4回に分けて投与する。関節内、筋肉内、皮下若しくは静脈内等に非経口投与される場合は、1回当たり約0.0001から100mgが、好ましくは0.001~10mgが適当である。投与頻度、投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定される。

本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、一つ又はそれ以上の活性化合物が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミ

ン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、更に安定化剤や溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣または胃溶性あるいは腸溶性化合物のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エチルアルコールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に溶解補助剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射剤用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エチルアルコールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 (商品名) 等がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤 (例えば、ラクトース)、溶解補助剤のような添加剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これらは又無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

本発明医薬に用いられる化合物の溶解性が低い場合には、可溶化処理を施してもよい。可溶化処理としては、医薬製剤に適用できる公知の方法、例えば界面活性剤を添加する方法、薬物と可溶化剤例えば高分子 (水溶性高分子や腸溶性高分子) との固体分散体を形成する方法が挙げられる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例にて本発明の有効成分である HDAC 阻害化合物の関節軟骨細胞外マト

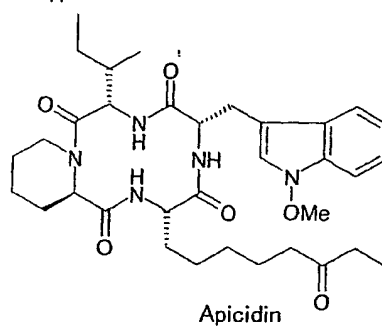
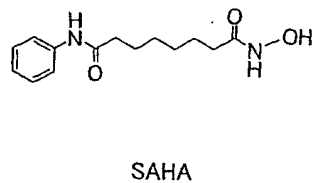
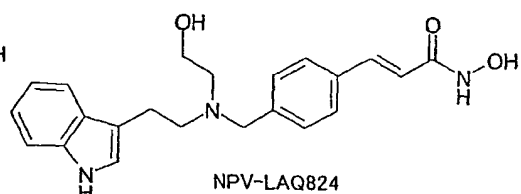
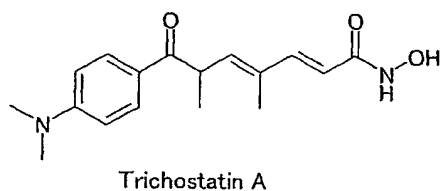
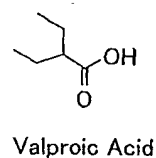
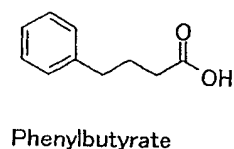
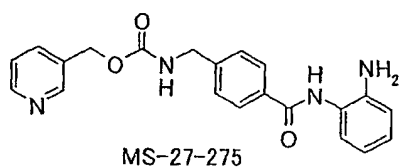
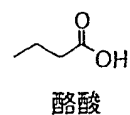
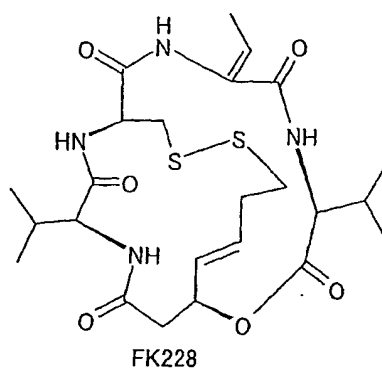
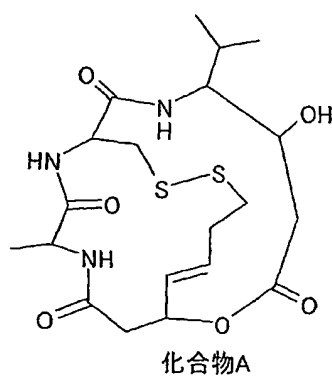
リクス分解阻害作用を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1：ウサギ軟骨初代培養細胞におけるプロテオグリカン (PG) 破壊阻害活性 (レチノイン酸刺激)

(試験方法)

ウサギ (日本白色種、オス、1.0~1.5kg) を過剰麻酔下で致死させた後、膝関節を摘出し、関節表面の軟骨層をメスにて剥離、細断した。さらに、トリプシン-EDTA (0.25%-1mM; GIBCO-BRL 社製) にて 37°C、1 時間処理の後、1500rpm、5 分で遠心分離し沈殿した細胞をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、GIBCO-BRL 社製) で洗浄した。続いてコラゲナーゼ A (0.15%; ベーリンガー・マンハイム社製) /DMEM にて 37°C、3~12 時間処理した後、ナイロンメッシュフィルター (100 μ m、Falcon 社製) 通過画分を 1500rpm、5 分の遠心分離にかけ、軟骨細胞を沈殿させた。DMEM/10%FBS 培地で十分に洗浄した後、DMEM/10%FBS 培地に 2×10^5 cells/ml になるように懸濁し、I 型コラーゲンをコートした 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) に 200 μ l/穴で蒔いた。3 日後に培地を 50 μ g/ml アスコルビン酸含有 DMEM/10%FBS 培地 (以下、アスコルビン酸培地) 200 μ l に交換し、さらに 2 日間培養を 2 回繰り返した。その後、ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞を終濃度 10 μ Ci/ml の $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 含有アスコルビン酸培地 200 μ l にて 3 日間培養、標識した後、200 μ l のアスコルビン酸培地で 3 回洗浄し、200 μ l のアスコルビン酸培地で 1 日間培養した。終濃度 1 μ M の all-trans レチノイン酸 (シグマ社製) で刺激し、48 時間後の培養上清を 20 μ l ずつ回収し、トップカウント (Packard 社製) を用い、放射活性を計測した。被験化合物は刺激開始と同時に添加し、レチノイン酸非添加群を 100%、レチノイン酸添加群を 0%とした百分率でその PG 分解阻害活性を算出した。

(被験化合物)



(結果) 結果を下表 1 に示す。各 HDAC 阻害化合物は、構造に関係なく、その HDAC 阻害を示す濃度域において、濃度依存的に PG 分解を阻害することが判明した。

表 1

被験化合物	濃度	PG 分解阻害 (%)
化合物 A	1000 nM	98
	100 nM	93
	10 nM	51
	1 nM	20
FK228	100 nM	97
	10 nM	39
MS-27-275	10 μ M	87
	1 μ M	52
酪酸(Na 塩)	3 mM	93
	0.3 mM	27
Phenylbutyrate	3 mM	66
	1 mM	14
	0.3 mM	-2
Valproic acid (Na 塩)	3 mM	79
	1 mM	46
	0.3 mM	49
Trichostatin A	1000 nM	58
	100 nM	40
NVP-LAQ824	300 nM	90
	30 nM	26
SAHA	3000 nM	71
	300 nM	13
Apicidin	300 nM	92
	30 nM	25

実施例 2：ウサギ軟骨初代培養細胞における PG 破壊阻害活性 (IL-1 刺激)

(試験方法)

実施例 1 と同様にしてウサギ軟骨初代培養細胞を調製した。終濃度 10ng/ml のヒト IL-1 β (R&D System 社製) で刺激し、48 時間後の培養上清を 20 μ l ずつ回収し、トップカウント (Packard 社製) を用い、放射活性を計測した。被験化合物は刺激開始と同時に添加し、IL-1 非添加群を 100%、IL-1 添加群を 0%とした百分率でその PG 分解阻害活性を算出した。

(結果) 結果を下表 2 に示す。被験化合物である各種 HDAC 阻害化合物は、その

HDAC 阻害を示す濃度域において、PG 分解を阻害することが判明した。

表 2

被験化合物	濃度	PG 分解阻害 (%)
化合物 A	30 nM	61
	3 nM	39
	0.3 nM	6
FK228	30 nM	97
MS-27-275	30 nM	95
酪酸 (Na 塩)	5 mM	78

上記実施例 1 並びに 2 の試験方法は、関節軟骨に対する被験化合物の作用、特に細胞外マトリクスの分解・変性に対する作用を評価する簡便な評価法として、従来より関節疾患治療剤のスクリーニングに広く用いられている方法である (Spirito S. et al, Agents Actions; 39, C160-2, 1993)。実際、in vitro において、レチノイン酸または IL-1 等による PG 分解を抑制する作用があるマトリクスメタロプロテアーゼ阻害剤 (Lawrence J. et al, Arch Biochem Biophys. 344(2), 404-12, 1997) は、骨関節炎モデルマウスにおいても細胞外マトリクスの分解・変性を良好に抑制することが確認されている (Ann Rheum Dis. 54(8), 662-9, 1995, J Exp Med. 182(2), 449-57, 1995, Adv Dent Res. 12(2), 82-5, 1998 及び Inflamm Res. 49(4), 144-6, 2000)。よって、本評価系で優れた効果が確認された本発明の有効成分である HDAC 阻害化合物は、関節軟骨細胞外マトリクスの分解・変性を抑制する薬剤として有用である。特に、本発明の有効成分である HDAC 阻害化合物は、軟骨細胞外マトリクスの分解・変性を惹起する代表的な刺激物質である IL-1 或いはレチノイン酸のいずれに対しても良好に関節軟骨細胞細胞外マトリクスの分解・変性を抑制する作用を有し、刺激物質の種類にかかわらず軟骨細胞細胞外マトリクスの分解・変性を抑制する薬剤として有用である。

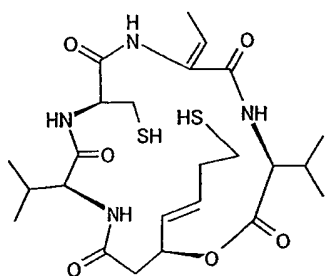
産業上の利用可能性

本発明医薬の有効成分である HDAC 阻害化合物は、前記実施例に示したように、関節軟骨細胞外マトリクスの分解を良好に阻害することから、本発明医薬は、特に関節軟

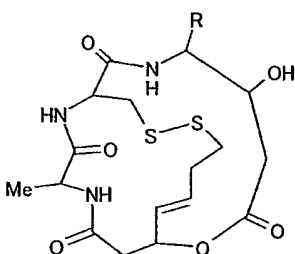
骨細胞外マトリクスの分解・変性の関与する骨関節炎、関節リウマチ、変形性関節症等の予防又は治療剤として有用である。

請 求 の 範 囲

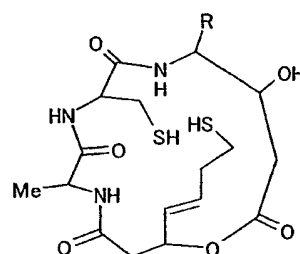
1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物を有効成分として含有する関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害剤。
2. 前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物が、FK228、下式 (I) で示されるデプシペプチド化合物、下記一般式 (II) で示されるデプシペプチド化合物、下記一般式 (IIa) で示されるデプシペプチド化合物、MS-27-275、Trichostatin A、NVP-LAQ824、SAHA、Apicidin、Phenylbutyrate、Valproic acid、Pivaloyloxymethyl butyrate、CI-994、Depudecin、Trapoxin、CHAP 及び酪酸から選択される請求の範囲 1 記載の剤。



(I)



(II)



(IIa)

(式中 R は、イソプロピル基、sec-ブチル基又はイソブチル基を意味する。)

3. 前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物が、FK228、請求の範囲 2 記載の式 (I) で示されるデプシペプチド化合物、請求の範囲 2 記載の一般式 (II) で示されるデプシペプチド化合物、請求の範囲 2 記載の一般式 (IIa) で示されるデプシペプチド化合物、MS-27-275、Trichostatin A、NVP-LAQ824、SAHA、Apicidin、Phenylbutyrate 及び Valproic acid から選択される請求の範囲 1 記載の剤。
4. 前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物が、「吉田ら、Journal of Biological Chemistry、1990 年、第 265 巻、p17174-17179」記載の方法により測定したヒストン脱アセチル化酵素阻害活性 (IC₅₀ 値) が 100 μ M 以下の濃度の化合物である請求の範囲 1 記載の剤。
5. 骨関節炎の予防又は治療剤である請求の範囲 1 記載の剤。

6. 関節リウマチの予防又は治療剤である請求の範囲 1 記載の剤。
7. 変形性関節症の予防又は治療剤である請求の範囲 1 記載の剤。
8. ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物を有効成分として含有する骨関節炎における関節軟骨細胞外マトリクス分解の予防又は治療剤。
9. ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物を有効成分として含有する関節リウマチにおける関節軟骨細胞外マトリクス分解の予防又は治療剤。
10. ヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物を有効成分として含有する変形性関節炎における関節軟骨細胞外マトリクス分解の予防又は治療剤。
11. 関節軟骨細胞外マトリクス分解阻害用医薬の製造の為のヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物の使用。
12. 関節軟骨細胞外マトリクス分解に起因する疾患の予防及び治療方法であって、治療有効量のヒストン脱アセチル化酵素阻害化合物を患者に投与することからなる予防及び治療方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 31/16, 31/167, 31/19, 31/4045, 31/4406, 38/55,
A61P19/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 31/16, 31/167, 31/19, 31/4045, 31/4406, 38/55,
A61P19/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN),
JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/055017 A2 (WAKE FOREST UNIVERSITY), 18 July, 2002 (18.07.02), Particularly, abstract; Claims; page 6, lines 6 to 10 & WO 02/055017 A3 & US 2003/114525 A1 & US 2003/082666 A1	1-11
Y	WO 02/06307 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 January, 2002 (24.01.02), Particularly, abstract; Claims; page 11, line 3 to page 14, line 10 & EP 1302476 A1	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 18 November, 2003 (18.11.03)	Date of mailing of the international search report 02 December, 2003 (02.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95/13289 A1 (CHIROSCIENCE LTD.), 18 May, 1995 (18.05.95), Particularly, abstract; Claims; page 1, lines 20 to 32 & EP 728144 A1 & EP 728144 B1 & JP 9-505041 A & AU 9481133 A1 & AU 679286 B2 & HU 73799 A2 & CN 1134705 A & BR 9408025 A & ES 2143611 T3 & PL 180403 B1 & CZ 287780 B6 & FI 9601976 A & NO 9601888 A & HK 1015139 A1	1-11
Y	Naoki ISHIGURO, "Mansei Kansetsu Rheumatism to Saibogai Matrix Hakai", Igaku no Ayumi, 1996, Vol.177, No.1, pages 81 to 85; full text	1-11
Y	JP 2001-354694 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 December, 2001 (25.12.01), Particularly, abstract; Claims (Family: none)	1-11
Y	JP 2001-348340 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 December, 2001 (18.12.01), Particularly, abstract; Claims (Family: none)	1-11
Y	SAITO, A. et al., A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors, Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 1999, Vol.96, No.8, pp.4592-7; particularly, abstract	1-11
Y	NAKAJIMA, H. et al., FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor, Exp.Cell.Res., 1998, Vol.241, No.1, pp.126-33; full text	1-11
Y	WO 02/22577 A2 (NOVARTIS-ERFINDUGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT), 21 March, 2002 (21.03.02), Particularly, abstract; Claims; example P2 & WO 02/22577 A3 & EP 1318980 A2 & US 2003/018062 A1 & US 6552065 B2 & AU 2001082129 A5 & BR 2001013669 A & NO 2003000867 A	1-11
Y	RICHAO, V.M et al., A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases, Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 1998, Vol.95, No.6, pp.3003-7; particularly, abstract	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAN, J.-W. et al., Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21 ^{WAF1/Cip1} and gelsolin, Cancer Res., 2000, Vol.60, No.21, pp.6068-74; particularly, abstract	1-11
Y	WARRELL, R.P. Jr. et al., Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase., J.Natl.Cancer Inst., 1998, Vol.90, No.21, pp.1621-5; particularly, abstract	1-11
Y	JOHNSTONE, R.W. et al., Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, Nat.Rev.Drug Discov., 2002 April, Vol.1, No.4, pp.287-99; full text	1-11
Y	GÖTTLICHER, M. et al., Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells, EMBO J., 2001, Vol.20, No.24, pp.6969-78; particularly, abstract	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10460

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
- ☒
- Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

- 2.
- ☐
- Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3.
- ☐
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K45/00, 31/16, 31/167, 31/19, 31/4045, 31/4406, 38/55, A61P19/02, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K45/00, 31/16, 31/167, 31/19, 31/4045, 31/4406, 38/55, A61P19/02, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), REGISTRY(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/055017 A2(WAKE FOREST UNIVERSITY)2002.07.18 特に、Abstract, Claims, 第6ページ 第6-10行 & WO 02/055017 A3 & US 2003/114525 A1 & US 2003/082666 A1	1-11
Y	WO 02/06307 A1(藤沢薬品工業株式会社)2002.01.24 特に、Abstract, 請求の範囲, 第11ページ 第3行-第14ページ 第10行 & EP 1302476 A1	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.11.03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

津下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 95/13289 A1(CHIROSCIENCE LIMITED)1995.05.18 特に、Abstract, Claims, 第1 ^o - ^o 第20-32行 & EP 728144 A1 & EP 728144 B1 & JP 9-505041 A & AU 9481133 A1 & AU 679286 B2 & HU 73799 A2 & CN 1134705 A & BR 9408025 A & ES 2143611 T3 & PL 180403 B1 & CZ 287780 B6 & FI 9601976 A & NO 9601888 A & HK 1015139 A1	1-11
Y	石黒 直樹、慢性関節リウマチと細胞外マトリックス破壊、医学の あゆみ、1996年、Vol. 177, No. 1、第81-85 ^o - ^o 、 文献全体	1-11
Y	JP 2001-354694 A(山之内製薬株式会社)2001.12.25 特に、【要約】、【請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-11
Y	JP 2001-348340 A(山之内製薬株式会社)2001.12.18 特に、【要約】、【請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-11
Y	SAITO, A. et al, A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, Vol.96, No.8, pp.4592-7 特に、Abstract	1-11
Y	NAKAJIMA, H. et al, FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor, Exp. Cell Res., 1998, Vol.241, No.1, pp.126-33, 文献全体	1-11
Y	WO 02/22577 A2(NOVARTIS-ERFINDUGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT)2002.03.21 特に、Abstract, Claims, Example P2 & WO 02/22577 A3 & EP 1318980 A2 & US 2003/018062 A1 & US 6552065 B2 & AU 2001082129 A5 & BR 2001013669 A & NO 2003000867 A	1-11
Y	RICHAO, V. M et al, A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol.95, No.6, pp3003-7, 特に、Abstract	1-11

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HAN, J.-W. et al, Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21 ^{WAF1/Cip1} and gelsolin, Cancer Res., 2000, Vol.60, No.21, pp.6068-74, 特に、Abstract	1-11
Y	WARRELL, R. P. Jr. et al, Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase., J. Natl. Cancer Inst., 1998, Vol.90, No.21, pp.1621-5 特に、Abstract	1-11
Y	JOHNSTONE, R. W. et al, Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, Nat. Rev. Drug Discov., 2002 Apr., Vol.1, No.4, pp.287-99 文献全体	1-11
Y	GÖTTLICHER, M. et al, Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells, EMBO J., 2001, Vol.20, No.24, pp.6969-78 特に、Abstract	1-11

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1 2 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲1 2は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)